

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, 1/02, G01N 33/50</b>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/01644</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>16. Januar 1997 (16.01.97)</b>

(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE96/01183</b>	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>27. Juni 1996 (27.06.96)</b>	
(30) Prioritätsdaten: 195 25 285.3 28. Juni 1995 (28.06.95) DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN- FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gaters- leben (DE).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): WOBUS, Anna, Magda- lene [DE/DE]; Liebigweg 7, D-06466 Gatersleben (DE). FRANZ, Wolfgang-Michael [DE/DE]; Fasanenring 15b, D- 23627 Groß Grönau (DE).	
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Roessle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	

(54) Title: IN VITRO TEST PROCEDURE FOR DETECTING CHEMICALLY-INDUCED EMBRYOTOXIC AND TERATOGENIC EFFECTS

(54) Bezeichnung: IN VITRO-TESTVERFAHREN ZUM NACHWEIS CHEMIKALIEN-INDUZIERTER EMBRYOTOXISCHER/TERATOGENER EFFEKTE

(57) Abstract

The invention concerns an in vitro test procedure for the detection of chemically induced effects on embryonic development and for differentiation for the purpose of embryotoxicity/teratogenicity screening based on differentiated pluripotent embryonic stem (ES) cells from mice and rats and using embryonic germ (EG) cells obtained from primordial germ cells. The proposed test procedure is characterised in that stable transgenic ES or EG cell clones containing tissue-specific promoters and reporter genes are selected, differentiation-dependent expression of tissue-specific genes is carried out following differentiation of ES cells in the presence of embryotoxic substances acting at specific times into different germination path derivatives; this is followed by detection of chemically induced activation, repression or modulation of tissue-specific genes which regulate embryonic development.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein in vitro-Testverfahren zum Nachweis von Chemikalien-induzierten Effekten auf die embryonale Entwicklung und Differenzierung für ein Embryotoxizitäts-/Teratogenitäts-Screening auf der Basis differenzierter pluripotenter embryonaler Stamm(ES)-Zellen der Maus und Ratte sowie an aus primordialen Keimzellen etablierten embryonalen Keim(EG)-Zellen. Das erfindungsgemäße Testverfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß stabile transgene ES- oder EG-Zell-Klone, die gewebspezifische Promotoren und Reportergene enthalten, selektiert werden, eine differenzierungsabhängige Expression gewebspezifischer Gene nach Differenzierung von ES-Zellen in Anwesenheit von zu bestimmten Zeiten einwirkenden embryotoxischen Substanzen in verschiedene Keimbahn-Abkömmlinge erfolgt und anschließend die Chemikalien-induzierte Aktivierung, Reprimierung oder Modulation gewebspezifischer und die Embryonalentwicklung regulierender Gene nachgewiesen wird.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BV	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Canada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonia	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

## In vitro-Testverfahren zum Nachweis Chemikalien-induzierter embryotoxischer/teratogener Effekte

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein in vitro-Testverfahren zum Nachweis Chemikalien-induzierter embryotoxischer(z. B. auch teratogener) Effekte auf der Basis differenzierender pluripotenter embryonaler Stamm(ES)-Zellen der Maus und Ratte sowie an aus primordialen Keimzellen etablierten embryonalen Keim(EG)-Zellen.

Der Nachweis teratogener Eigenschaften von chemischen Wirkstoffen erfolgt derzeit durch Bestimmungen der Reproduktions-toxizität von Prüfsubstanzen nach Einfach- und Mehrfachapplikation an trächtigen Laborsäugern und durch Prüfungen der Embryotoxizität in frühen Stadien der Schwangerschaft (Holz und Siegemund, Der Einsatz von Tieren in der Forschung und Entwicklung im Verbraucher- und Umweltschutz, Abschlußbericht zur Basiserhebung des Batelle-Instituts 1988). Des Weiteren werden in vitro-Versuche mit Säuger-Embryonen (Neubert und Merker, Cell culture techniques - applicability for studies on prenatal differentiation and toxicity, de Gruyter, Berlin - New York (1981)) und embryonalen Organen für Teratogenitätsteste eingesetzt. Diese Testverfahren haben jedoch den großen Nachteil, daß sie nach wie vor den Einsatz einer großen Anzahl von lebenden Säugern, insbesondere Ratten und Mäusen voraussetzen. In vitro-Testverfahren, bei denen Primärzellkulturen aus Extremitätenknospen (z.B. "limb buds", Kochhar, Teratology 11, 273-287 (1975)), oder Gehirnanlagen embryonaler Ratten (Flint and Orton, Toxicol. Appl. Pharmacol. 76, 383-395 (1984)) oder permanente Zelllinien aus embryonalen oder adulten Säugetiergegeweben oder aus menschlichen Geweben, wie Tumorzellen des Ovars oder embryonale Gaumenzellen eingesetzt wurden, erfüllen im engeren Sinn nicht die Anforderungen, die an Teratogenitätstests gestellt werden, nämlich Hinweise auf mögliche Entwicklungsstörungen während der Embryogenese zu geben.

Seit einigen Jahren gibt es Bemühungen, permanente Kulturen totipotenter/pluripotenter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) auch zum Nachweis embryotoxischer und mutagener Stoffe zu verwenden (Laschinski et al, *Reproductive Toxicol.* 5, 57-65 (1991), Newall and Beedles, *Toxicol. in Vitro* 8, 697-701 (1994), Sehlmeyer and Wobus, *Mutation Res.* 324, 69-76 (1994)). Embryonale Stammzellen sind die totipotenten Zellen des frühen Embryos, aus denen sich der komplette Säugetierorganismus entwickelt. Störungen während der Keimblatt- und pränatalen Entwicklung können zum Absterben der Embryonen (präimplantativem Tod), zu Entwicklungsstörungen, Fehlentwicklungen bzw. Mißbildungen führen.

Als in vitro-Systeme totipotenter bzw. pluripotenter Zellen sind 1. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen), permanente Linien totipotenter embryonaler Zellen (Evans and Kaufman, *Nature* 282, 507-509 (1981)) und

2. Embryonale Keimzellen ("embryonic germ cells", EG-Zellen), die aus primordialen Keimzellen (PGC) ca. 9 Tage alter Embryonen gewonnen und als permanente Zelllinien kultiviert werden (Stewart et al, *Dev. Biol.* 161, 626-628 (1994))

bekannt.

Sowohl ES-Zellen als auch EG-Zellen sind totipotent und nehmen in vivo nach Retransfer in die Blastozyste an der normalen Embryogenese teil und sind in der Lage, die Keimbahn zu kolonisieren (Bradley et al, *Nature* Bd. 309, 255-256 (1984), Matsui et al, *Cell* 70, 841-847 (1992)).

In vitro können ES-Zellen nach Differenzierung in Embryo-ähnlichen Aggregaten, sogenannten "embryoid bodies" Derivate aller drei Keimblätter bilden, d.h. in kardiogene (Doetschmann et al, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87, 27-45 (1985)), myogene (Rohwedel et al, *Dev. Biol.* 164, 87-101 (1994)), neuronale und hämatopoietische Zellen (Wiles and Keller, *Development* 111, 259-267 (1991)) differenzieren.

In bisherigen Experimenten wurde nachgewiesen, daß das Teratogen

Retinsäure (RA) zu gravierenden Veränderungen der Expression gewebespezifischer Gene führt, wenn es zu bestimmten Zeiten der "embryoid body"-Differenzierung einwirkte und zu Aktivierung, Hemmung oder Modulation der Expression von Herz- oder Skelettmuskel-spezifischen Genen führte (Wobus et al., Roux's Arch. Dev. Biol. 204, 1994, 36-45). Diese Aktivierung, Reprimierung oder Modulation der Genexpression kann auch über Reportergene, z. B. X-Gal oder Luziferase, sichtbar gemacht werden.

Bisherige *in vitro*-Verfahren mit ES-Zellen betreffen in erster Linie Testverfahren zum Nachweis der zytotoxischen Wirksamkeit embryotoxischer Verbindungen mit Hilfe des MTT-Testes (Laschinski et al s.o.). Dabei wurde in ES-Zellen eine höhere zytotoxische Sensitivität beobachtet als in differenzierten Zellen.

Untersuchungen zur Zytotoxizität mit Hilfe des "stem cell tests" zum Nachweis teratogener Effektivität wurden von Newall and Beedles, Toxicol. in Vitro 8, 697-701 (1994) beschrieben.

In allen diesen Untersuchungen dienten zytotoxische Effekte als Maß für embryoschädigende Eigenschaften teratogener/embryotoxischer Substanzen.

Es ist festzustellen, daß ES-Zellen das zur Zeit wichtigste Zellmodell in der Entwicklungsbiologie sind, vor allem zur Konstruktion transgener Organismen, ihr Einsatz in der Reproduktions- und Gentoxikologie bisher jedoch begrenzt ist.

Die Erfindung hat das Ziel, ein routinemäßig einsetzbares *in vitro*-Testverfahren zur Ermittlung Chemikalien-induzierter embryotoxischer/teratogener Effekte bereit zu stellen.

Die Aufgabe der Erfindung liegt darin, ein *in vitro*-Testverfahren zum Nachweis embryotoxischer/teratogener Eigenschaften von chemischen Wirkstoffen an embryonalen Stamm(ES)-Zellen oder an aus primordialen Keimzellen etablierten embryonalen Keim(EG)-Zellen zu entwickeln. Das Testverfahren soll insbesondere geeignet sein, Hinweise auf mögliche Entwicklungs- und Differenzierungsstörungen während der Embryogenese zu geben.

Die Erfindung wird gemäß der Ansprüche realisiert.

Es werden stabile transgene ES- oder EG-Stammzellklone konstruiert, bei denen ein bakterielles Reportergen LacZ oder das Luziferasegen unter die Kontrolle von gewebespezifischen Promotoren oder Entwicklungskontrollgenen gebracht wird. Nach Differenzierung der ES-Zellen in Anwesenheit teratogener Substanzen in die verschiedenen Keimbahnderivate erfolgt eine differenzierungsabhängige Expression in den Zellen, die die gewebespezifischen Promotoren exprimieren. Die Aktivierung, Reprimierung oder Modulation dieser gewebespezifischen Gene wird mit einer einfachen Färbereaktion, dem X-Gal Assay, bestimmt. Mit der Erfindung wird eine Batterie von relevanten Test-ES-Zellklonen entwickelt, die neben dem Reportergen LacZ (und einer Neomycin-kassette zur Selektion stabiler Transfektanten) Promotorsequenzen enthalten, die charakteristische und wesentliche Merkmale der ektodermalen und mesodermalen Linie regulieren. Das sollten insbesondere Gene sein, die die neuronale, kardiogene, die Muskel- und die Skelettentwicklung determinieren. Nach Transfektion dieser Vektoren in pluripotente ES-/EG-Zellen der Maus oder der Ratte werden stabile Stammzellklone selektiert und diese nach "embryoid body"-Entwicklung zu spezifischen Zeiten in Anwesenheit von Testsubstanzen differenziert (Abb.1). Danach kann die differenzierungsabhängige Expression der gewebespezifischen Gene mit Hilfe der X-Gal-Färbung in verschiedenen Entwicklungsstadien (unter Zeiteinhaltung und Einsatz dafür geeigneter Vektoren) nachgewiesen werden. Diese Färbetechnik ist standardisierbar und über photometrische Verfahren automatisierbar.

Mit diesem Testverfahren ist es möglich, in vitro Chemikalien-induzierte Veränderungen der zellulären Differenzierung, die während der Keimblattdifferenzierung und frühen embryonalen Entwicklung stattfinden und zu Entwicklungsstörungen führen, festzustellen. Bei dem erfindungsgemäßen Testverfahren werden keine lebenden Tiere, sondern permanente Zelllinien eingesetzt.

Der wesentliche Vorteil der Erfindung besteht darin, daß ein standardisierbares, im Routine-Screening einsetzbares in vitro

Modell etabliert wird, das zu einer Einsparung von Versuchstieren führt. So wurden im Bereich der Reproduktionstoxikologie in Deutschland pro Jahr (1987) ca. 20 000 Säugetiere und Vögel eingesetzt. Darüber hinaus werden eine große Anzahl von Säugern zur Entnahme embryonaler Organe und Gewebe (embryonale Herzmuskelzellen, "limb bud" Kulturen, "micromass"-Assay u.a.) benötigt, so daß die Gesamtzahl bei Tierzahlen von mindestens 50 000 liegen dürfte.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können im Vorscreening folgende Testverfahren teilweise ersetzt und ergänzt werden:

- in vivo-Segment II-Studien,
- Teste mit embryonalen Organen ("limb bud" Kulturen) und Primärkulturen
- Testverfahren mit artifiziellen Embryonen

Anschließend wird die Erfindung an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert, das die Anmeldung jedoch nicht beschränken soll.

#### Beispiel 1

Das Testverfahren ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Es werden transgene ES-Zellklone, bei denen LacZ unter der Kontrolle des ventrikelspezifischen MCL-2V Promotors (Franz et al, Circ. Res. 73 (1993) 629-638) exprimiert wird, für die Untersuchung solcher kardiotoxischen Substanzen eingesetzt, die zu Entwicklungsstörungen am Herzen führen.

Zum Einsatz kommen Klone, die mit dem Vektor pGNA-MLC 2.1-LacZ transfiziert wurden und MLC-2V stabil exprimieren.

Während der mesodermalen Differenzierung in embryoid bodies wird die Testsubstanz Retinsäure (RA) zugegeben (z. B. von Tag 5 bis 15) und anschließend eine X-Gal-Färbung der differenzierten embryoid bodies durchgeführt.

Abb.2 zeigt die Aktivierung der MLC-2V-Expression im MLC-Klon 3 durch  $10^{-8}$  M (E,F) und  $10^{-9}$  M (C,D) RA nach Behandlung zwischen 5. und 15. Tag der embryoid body-Differenzierung. Die Kontrollzel-

len (A,B) zeigen X-Gal-Färbung ohne Induktion durch die teratogene Substanz RA.

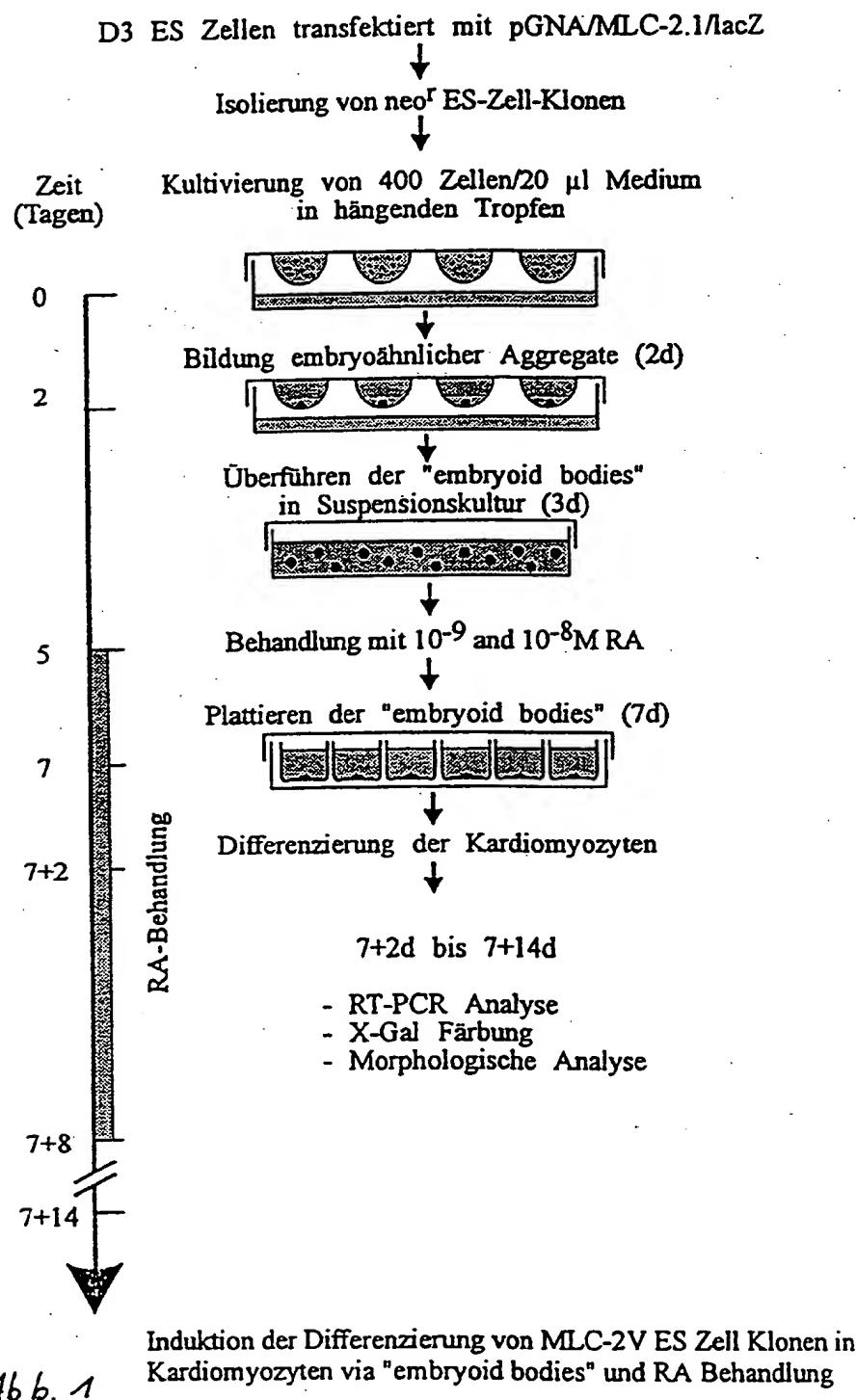
Die Vektoren werden auch zur Transfektion von EG-Zellen oder von Ratten-ES-Zellen benutzt.

## Patentansprüche

1. In vitro-Testverfahren zum Nachweis Chemikalien-induzierter embryotoxischer/teratogener Effekte auf der Basis differenzierender pluripotenter embryonaler Stamm(ES)-Zellen oder an aus primordialen Keimzellen etablierten embryonalen Keim(EG)-Zellen der Maus und Ratte durch
  - Selektion stabiler transgener ES-/EG-Zell-Klone,
  - differenzierungsabhängige Expression gewebespezifischer Gene von ES-/EG-Zell-Klonen in Anwesenheit von zu bestimmten Zeiten der in vitro Differenzierung einwirkenden teratogenen Substanzen und nachfolgende Differenzierung in die verschiedenen Keimbahnderivate und
  - Nachweis der Chemikalien-induzierten Aktivierung, Reprimierung oder Modulation von gewebespezifischen und die Embryonalentwicklung beeinflussenden Genen.
2. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Konstruktion der transgenen Zell-Klone beliebige Reportergene, z.B. LacZ oder Luciferase, unter die Kontrolle von gewebespezifischen Promotoren, die zellspezifische Strukturgene, Transkriptionsfaktoren oder Entwicklungskontrollgene kontrollieren, gebracht werden.
3. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1 + 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zell-Klone
  - das Reportergen LacZ und eine Neomycinkassette zur Selektion stabiler Transfektanten sowie
  - Promotorsequenzen von Genen, die charakteristische und wesentliche Merkmale der ektodermalen und mesodermalen Linie kodieren,enthalten.

4. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1 + 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Promotoren solche eingesetzt werden, die gewebespezifische Gene kodieren, wie z.B. Gene, die die neuro-nale Herz-, Muskel- oder Skelettentwicklung determinieren, oder Promotoren anderer Entwicklungskontrollgene (Hox oder Pax-Gene).
5. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1 + 2, dadurch gekenn-zeichnet, daß im Verlauf der Differenzierung durch exogene Testsubstanzen die Reporter-Genkonstrukte spezifisch aktiviert, reprimiert oder moduliert werden und daß die differenzierungs-abhängige Expression im Testverfahren über "embryoid body" - Differenzierung in verschiedene Linien, siehe 4, erfolgt.
6. In vitro-Testverfahren nach Anspruch 1 - 6, dadurch gekenn-zeichnet, daß durch Einwirkung von Chemikalien das Expressions-muster der Promotor-Reporter-Genkonstrukte beeinflußt und mit Hilfe der X-Gal-Färbung bestimmt wird.

## Protokoll zur kardiogenen Differenzierung



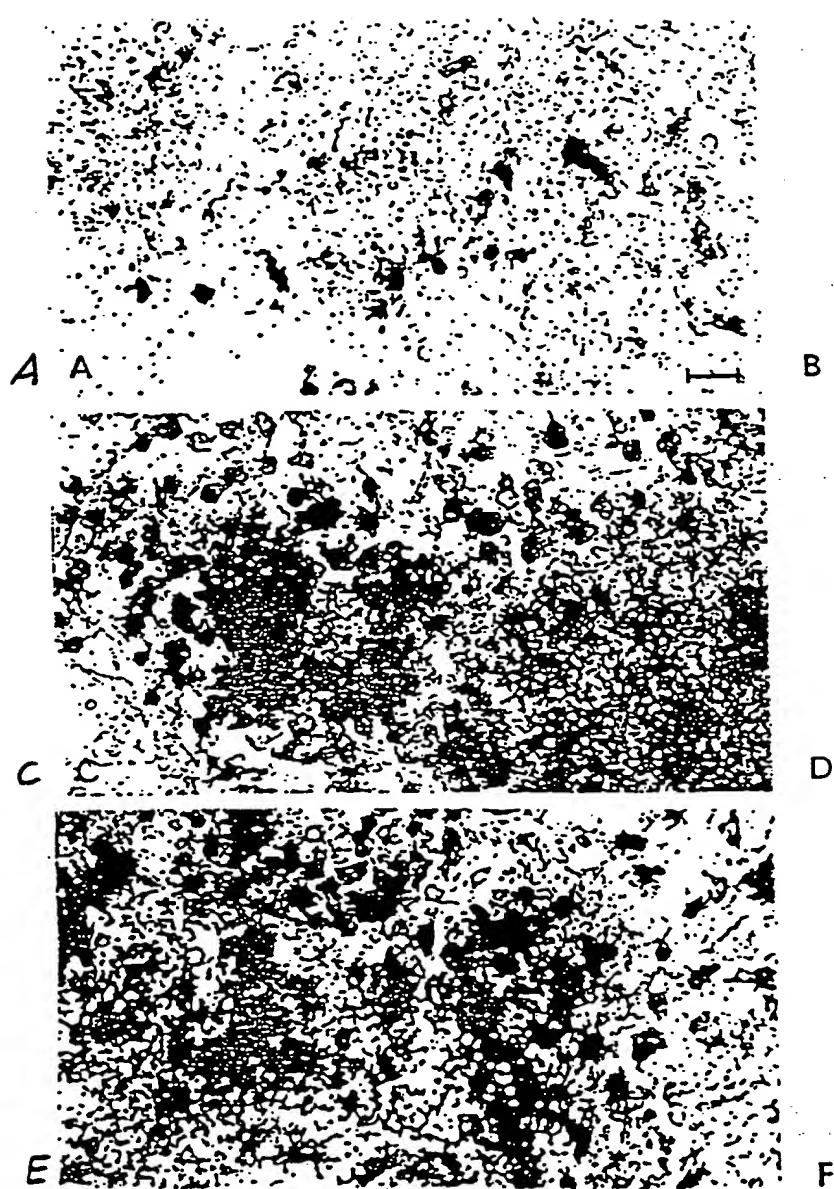


Abb. 2

Fig. A, B

Fig. C, D

Fig. E, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.  
PCT/DE 96/01183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 9, no. 4, April 1995, BETHESDA, MD US, page A942 XP000196437 C-C. LAI: "Genetic engineered mouse embryonic stem (ES) cells for the detection of mutation during the early development" see the whole document ---	1-6
X	EP,A,0 370 813 (TRANSGENIC SCIENCES, INC) 30 May 1990 see column 1 - column 14 ---	1-3,6
A	US,A,5 346 812 (R.W. VOELLMY ET AL.) 13 September 1994 see the whole document ---	1-4,6

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

30 September 1996

Date of mailing of the international search report

18.10.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/DE 96/01183

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TOXICOLOGY IN VITRO, vol. 8, no. 4, 1994, OXFORD GB, pages 697-701, XP000196434 D.R. NEWALL ET AL.: "The stem-cell test: a novel in vitro assay for teratogenic potential" cited in the application see the whole document ---	1
A	WO,A,89 05864 (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 29 June 1989 see page 11, line 12 - line 19 see page 35, line 15 - page 38, line 31 ---	1,2,4
A	DD,A,299 439 (ZENTRALINSTITUT FÜR GENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG) 16 April 1992 see the whole document ---	1
A	GENES AND DEVELOPMENT, vol. 5, no. 9, September 1991, GB, pages 1513-1523, XP000562802 G. FRIEDRICH ET AL.: "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice" see the whole document -----	1,3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No  
PCT/DE 96/01183

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0370813	30-05-90	CA-A-	2003415	25-05-90
		JP-A-	2145200	04-06-90
		JP-B-	6030623	27-04-94
		JP-A-	4084900	18-03-92
US-A-5346812	13-09-94	NONE		
WO-A-8905864	29-06-89	AU-A-	2900389	19-07-89
		EP-A-	0390857	10-10-90
		JP-T-	3502882	04-07-91
DD-A-299439	19-10-95	NONE		

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intr. Aktenzeichen  
PCT/DE 96/01183

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes  
IPK 6 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, Bd. 9, Nr. 4, April 1995, BETHESDA, MD US, Seite A942 XP000196437 C-C. LAI: "Genetic engineered mouse embryonic stem (ES) cells for the detection of mutation during the early development" siehe das ganze Dokument ---	1-6
X	EP,A,0 370 813 (TRANSGENIC SCIENCES, INC) 30.Mai 1990 siehe Spalte 1 - Spalte 14 ---	1-3,6
A	US,A,5 346 812 (R.W. VOELLMY ET AL.) 13.September 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-4,6

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siche Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30.September 1996

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

18.10.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaanla 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

De Kok, A

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 96/01183

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TOXICOLOGY IN VITRO, Bd. 8, Nr. 4, 1994, OXFORD GB, Seiten 697-701, XP000196434 D.R. NEWALL ET AL.: "The stem-cell test: a novel in vitro assay for teratogenic potential" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1
A	WO,A,89 05864 (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 29.Juni 1989 siehe Seite 11, Zeile 12 - Zeile 19 siehe Seite 35, Zeile 15 - Seite 38, Zeile 31 ---	1,2,4
A	DD,A,299 439 (ZENTRALINSTITUT FÜR GENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG) 16.April 1992 siehe das ganze Dokument ---	1
A	GENES AND DEVELOPMENT, Bd. 5, Nr. 9, September 1991, GB, Seiten 1513-1523, XP000562802 G. FRIEDRICH ET AL.: "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice" siehe das ganze Dokument -----	1,3
1		

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01183

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0370813	30-05-90	CA-A-	2003415	25-05-90
		JP-A-	2145200	04-06-90
		JP-B-	6030623	27-04-94
		JP-A-	4084900	18-03-92
US-A-5346812	13-09-94	KEINE		
WO-A-8905864	29-06-89	AU-A-	2900389	19-07-89
		EP-A-	0390857	10-10-90
		JP-T-	3502882	04-07-91
DD-A-299439	19-10-95	KEINE		